第 41 卷 增刊
1998 年 9 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 41, Suppl.
Sept., 1998

杀虫药剂和植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用*

高希武 赵 颖** 王 旭 董向丽 郑炳宗
(中国农业大学昆虫学系，北京 100094)

摘要 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中肠羧酸酯酶（CarEs）比活力随幼虫发育阶段呈有规律的变化。5 日龄以前 CarEs 比活力增长比较缓慢，5 日龄以后 CarEs 比活力快速增长，8 日龄开始 CarEs 比活力下降，直到预蛹期，CarEs 比活力又开始上升。用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离到的 9 条同功酶带中，E2、E4、E5、E6、E7 和 E9 对 β-乙酸萘酯（β-NA）的水解活性高于对 α-乙酸萘酯（α-NA），E1、E3、和 E8 对上述两种底物的水解活性正好相反，对 α-NA 活性高于对 β-NA。低剂量的对硫磷、马拉硫磷、倍硫磷、增效磷（SV1）、灭多威和溴氰菊酯对棉铃虫中肠 CarEs 比活力和对底物的亲和力具有明显的影响。药剂处理后 48 h，CarEs 的比活力明显降低，对底物的亲和力则与药剂的种类有关。马拉硫磷处理后 48h，在观察到的 6 条主要同功酶带中，E3 的活性明显降低，其次是 E6、E2 和 E1；而 E5 的活性则明显升高，E4 的活性也有所升高。用含 0.01% 的芸香苷、2-十三烷酮和槲皮素的人工饲料饲养棉铃虫经 2 代或 7 代后，CarEs 比活力均明显升高。

关键词 棉铃虫，羧酸酯酶，杀虫药剂，植物次生性物质

羧酸酯酶（CarEs）是昆虫对杀虫药剂代谢最重要的酶系之一，特别是对拟除虫菊酯和有机磷类杀虫药剂的代谢[1]。CarEs 也是杀虫药剂代谢中唯一不需要额外能量能够催化酯类化合物水解的一类酶系[2]。已经证明 CarEs 在许多昆虫的抗药性中起着重要的作用[3,4]。棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）是许多经济作物的主要害虫[5]，目前，棉铃虫的抗药性已经成了化学防治能否奏效的重要因子，高希武等[6,7]，已经报道了一些化合物，能够改变棉铃虫体内 CarEs 以及其它解毒酶系的活性。本文主要是报道棉铃虫体内 CarEs 的发育期变化以及杀虫药剂和植物次生性物质对棉铃虫体内 CarEs 的诱导作用及其与棉铃虫耐药性的关系。

1 材料和方法

1.1 化学试剂

α-乙酸萘酯（α-NA）和 β-乙酸萘酯（β-NA），上海试剂一厂产品；2-十三烷酮为 Aldrich 产品；槲皮素为中国预防医学科学院产品；芸香苷为上海黄河制药厂产品。杀

* 国家自然科学基金资助项目
** 现工作单位：辽宁省沈阳市植保站
1997-06-27 收稿，1998-04-23 收修改稿

虫药剂均为含量大于90%的原药。

1.2 供试虫源

棉铃虫在室内饲养，光照16 h，温度为25℃，新采集的田间棉铃虫种群在室内人工饲料上饲养6~8代后，分别用以下4种饲料饲养，（1）只用人工饲料；（2）加0.01%的槲皮素；（3）加0.01%的芸香苷和（4）加0.01%的2-十三烷酮。在不同世代分别测定4个棉铃虫种群CarEs的活性。刚从卵中孵化出来的幼虫为初孵幼虫（1日龄），从初孵幼虫到化蛹大约15 d左右。

1.3 CarEs活性测定

（1）酶液提取：将棉铃虫幼虫解剖，取其中肠，清除内容物，置-20℃冰箱储存。5日龄以前幼虫不用解剖，饥饿6 h后，用玻棒赶出内容物直接冷藏或匀浆。用前加磷酸缓冲液（0.04 mol/L，pH7.0）匀浆，在4℃，3 000 g离心15 min或6 000 g离心10 min，取上清液用于酶活性测定；（2）CarEs活性测定按Asperen[8]方法测定。

1.4 CarEs同功酶电泳

参照张龙翔[9]和Devonshire和Moores[10]方法，分离胶为7%（含0.25%的Triton X-100），浓缩胶为2.5%，在6℃，稳流（16 mA）电泳3 h，经染色、脱色后的胶板用CS910扫描仪扫描。

2 结果与分析

2.1 不同日龄棉铃虫幼虫羧酸酯酶比活力变化

图1显示出棉铃虫中肠羧酸酯酶（CarEs）比活力随幼虫发育阶段呈有规律的变化。5日龄以前CarEs比活力增长比较缓慢，5日龄以后CarEs比活力快速增长，8日龄开始CarEs比活力下降，直到预蛹期，CarEs比活力又开始上升。6和8日龄幼虫CarEs比活力最高，分别为162 mOD/(mg·min)和145 mOD/(mg·min)，相当于1日龄幼虫的5.3和4.7倍。棉铃虫每头幼虫的CarEs总活力（OD/min）与日龄呈明显的正相关，CarEs活性呈指数增长（图2）。以尚未取食的初孵幼虫的CarEs总活性为标准，5日龄棉铃虫幼虫CarEs活性是初孵幼虫CarEs活性的615%，平均每天增长103%；6日龄幼虫在1 d内CarEs活性增长了925%；8日龄幼虫在2d内CarEs增长了2.13倍，平均每天增长106.5%；9日龄幼虫在1 d内CarEs活性增长了34%；12日龄幼虫在3 d内CarEs活性增长了254%，平均每天增长84.7%；13日龄幼虫在1 d内CarEs活性增长了50.8%。以上各时期内CarEs活性相对增长速度，以6日龄幼虫（相当于3龄幼虫）增长最快，9日龄幼虫增长最慢，但是仍达到34%的增长率。

2.2 棉铃虫幼虫羧酸酯酶同功酶底物专一性

在对棉铃虫幼虫CarEs进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后，将胶板分为两半，分别用α-NA和β-NA进行染色。结果表明以α-NA为底物时的染色速度明显高于以β-NA为底

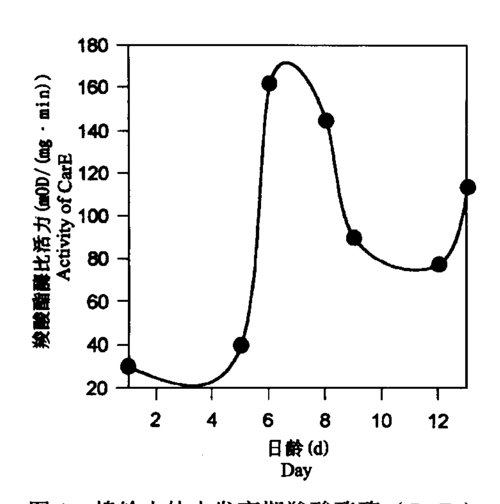


图 1　棉铃虫幼虫发育期羧酸酯酶（CarEs）比活力变化

Fig. 1　Developmental change of carboxylesterase specific activity in cotton bollworm larvae

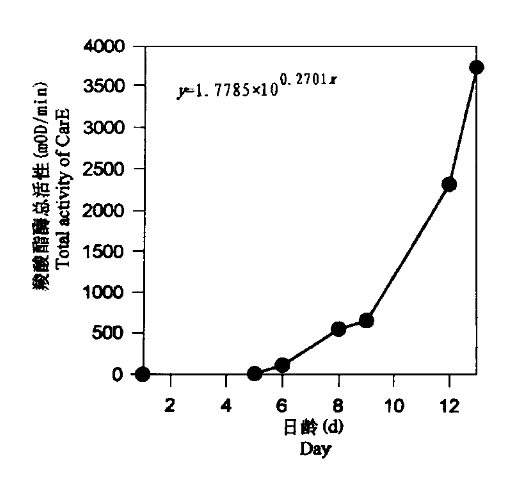


图 2　棉铃虫幼虫的 CarEs 总活力（mOD/min）与日龄的关系

Fig. 2　Relationship between total activity of carboxylesterase and age of cotton bollworm larvae

物时的染色速度，说明 CarEs 催化水解 α-NA 的能力高于 β-NA。根据电泳扫描图将电泳图谱分成为 9 个区域，没有发现单一水解 α-NA 或 β-NA 的 CarEs 同功酶带。图 3 显示出 9 个区域同功酶对 α-NA 和 β-NA 水解活性的比值变化。比值小于 1 的同功酶带，说明该酶带水解 α-NA 的活性所占总活性的比例小于对 β-NA 水解所占的比例。E2、E4、E5、E6、E7 和 E9 对 β-NA 的水解活性高于 α-NA，E1、E3 和 E8 对上述两种底物的水解活性正好相反，对 α-NA 活性高于 β-NA。说明 CarEs 不同的同功酶对 α-NA 和 β-NA 的水解活性是不同的。E3 水解 α-NA 的能力最强，占全部水解 α-NA 酶活性的 31%；E6 水解 β-NA 的能力最强，占全部水解 β-NA 酶活性的 32%。对 α-NA 和 β-NA 水解能力都较强的是 E6。实际上，E6 包含了几个同功酶带。

2.3　杀虫药剂对棉铃虫幼虫羧酸酯酶的诱导作用

表 1 显示出用低于死亡率 5%的剂量点滴处理棉铃虫 3 龄幼虫（平均体重 10.5 mg/头）48 h后，对 CarEs 的影响。在试验的药剂中，处理后 48 h CarEs 活性除灭多威外均明显降低；对底物的亲和力除灭多威和增效磷明显升高外，其余均明显降低。对硫磷对 CarEs 底物亲和力的影

表 1　杀虫药剂对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用（48 h）

Table 1　Induction of carboxylesterase by insecticides in cotton bollworm

杀虫药剂 Insecticide	活性 Activity		亲和力 Affinity	
	α-NA	β-NA	α-NA	β-NA
对硫磷 parathion	降低 decrease	降低 decrease	?	?
马拉硫磷 malathion	降低 decrease	降低 decrease	降低 decrease	降低 decrease
倍硫磷 fenthion	降低 decrease	降低 decrease	—	降低 decrease
增效磷 SV1	降低 decrease	降低 decrease	—	升高 increase
灭多威 methomyl	无变化 no induction	降低 decrease	升高 increase	升高 increase
溴氰菊酯 deltamethrin	降低 decrease	降低 decrease	无变化 no induction	降低 decrease

注：?：表示没有肯定性结果（no determined results）

响，在不同的试验中有所差异。

用剂量为$7.97\times10^{-3}\mu g$/头的对硫磷和剂量为$5.7\times10^{-5}\mu g$/头的溴氰菊酯处理棉铃虫幼虫24 h和48 h后的存活率均为100%。在处理后48 h，对硫磷和溴氰菊酯处理组α-NA CarEs和β-NA CarEs的比活力均明显低于对照组。溴氰菊酯处理组和对照组随时间的延长其绝对值呈增长趋势，而对硫磷处理组则呈明显下降趋势，这可能与对硫磷和其氧化型代谢物对CarEs具有抑制作用而溴氰菊酯没有抑制作用有关。处理后24 h和48 h，对照组棉铃虫CarEs对α-NA的米氏常数值呈显著增长趋势，对β-NA的米氏常数值无显著变化。而溴氰菊酯处理后24 h和48 h，棉铃虫CarEs对α-NA的米氏常数值无显著影响，对β-NA的米氏常数值在24 h无显著影响；到处理后48 h，对β-NA的米氏常数值显著提高，说明由于溴氰菊酯的作用，CarEs对β-NA的亲和力有下降的趋势。

表2显示出马拉硫磷处理后棉铃虫CarEs活性下降。α-NA CarEs的活性是对照组的49%，β-NA CarEs的活性是对照组的44%。从米氏常数（K_m值）的变化看，处理组CarEs对α-NA和β-NA的亲和力都显著降低。

表2 马拉硫磷对棉铃虫3龄幼虫羧酸酯酶的诱导作用

Table 2 Induction of carboxylesterase by malathion in 3rd instar of cotton bollworm larvae

	α-NA OD值* α-NA OD value	β-NA OD值* β-NA OD value	α-NA亲和常数** affinity constants	β-NA亲和常数** affinity constants
处理 treatment	0.325(0.49)	0.413(0.44)	0.217(0.213～0.221)	0.854(0.844～0.863)
对照 control	0.665(1.00)	0.94(1.00)	0.139(0.135～0.144)	0.461(0.411～0.524)

* OD值项括号中为相对于对照组的百分率；**亲和常数项括号中为95%置信限，单位为mmol/L

* value is percentage of control in parenthesis; ** value is 95% CL in parenthesis, mmol/L

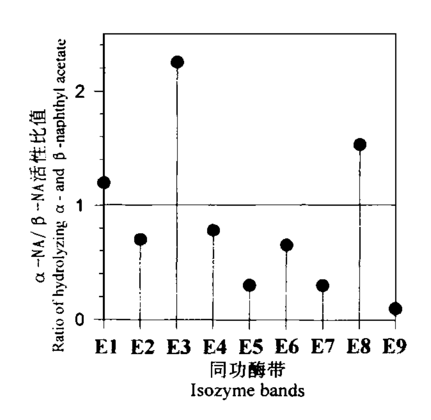


图3 棉铃虫幼虫同功酶对α-NA和β-NA水解活性的变化

Fig. 3 Comparison of carboxylesterase isozymes hydrolyzing α- and β-naphthyl acetate in cotton bollworm larvae

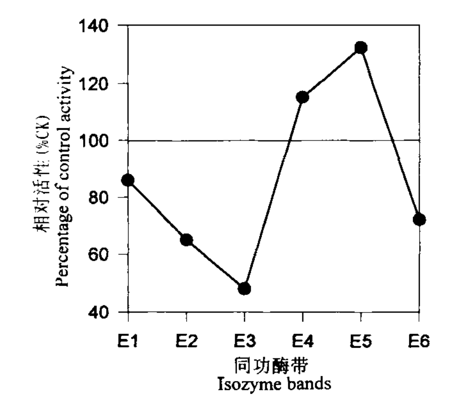


图4 马拉硫磷对棉铃虫幼虫CarEs同功酶的诱导作用

Fig. 4 Induction of carboxylesterase isozymes by malathion in cotton bollworm larvae

图 4 显示出马拉硫磷处理组和对照组的 CarEs 聚丙烯酰胺凝胶电泳后，同功酶活性的变化。E3 的活性明显降低，其次是 E6、E2 和 E1；而 E5 的活性则明显提高，其次是 E4。说明马拉硫磷对 E5 和 E4 同功酶活性具有明显的诱导增加作用，对其他同功酶具有抑制作用。由于 E1、E2、E3 和 E6 占的比例较大，使马拉硫磷诱导组的总的 CarEs 活性表现为降低。CarEs 在有机磷抗性中研究的最清楚的是马拉硫磷[11,12]，在一些昆虫中已经证明，马拉硫磷的抗性与专一性的羧酸酯酶同功酶有关[13,14]，图 4 中的 E4、E5 可能与棉铃虫对马拉硫磷的水解有关。

2.4 植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用

图 5 显示出用含有 0.1% 的芸香苷（RF7）、2-十三烷酮（TF2）和槲皮素（QF2）的人工饲料和只用人工饲料（CK）饲养的 4 个棉铃虫种群 CarEs 的比活力变化。芸香苷 F7 代种群 CarEs 比活力和对照种群比提高了近 4 倍；2-十三烷酮 F2 和槲皮素 F2 代种群 CarEs 比活力分别提高了 3 倍和 2.5 倍。说明植物次生性物质对棉铃虫 CarEs 活性具有明显的诱导作用。

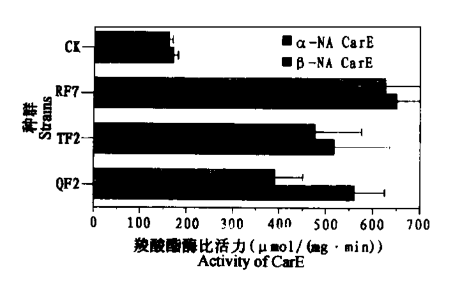


图 5　植物次生性物质对棉铃虫幼虫 CarEs 的诱导作用

Fig. 5　Induction of carboxylesterase by plant allelochemicals in cotton bollworm larvae

3 讨论

研究结果表明不同日龄的棉铃虫幼虫 CarEs 比活力明显不同。3 龄以前 CarEs3 比活力明显低于 3 龄以后，每头幼虫的 CarEs 总活力随日龄呈指数增长。棉铃虫幼虫 CarEs 比活力在 3 龄以后的突增可能与棉铃虫的耐药性增加有关，棉铃虫乙酰胆碱酯酶敏感度随发育期的变化也有类似的规律[15]。棉铃虫幼虫 CarEs 活性变化与体重呈明显的线性关系，这可能是棉铃虫体重对耐药性影响的内在原因之一。

CarEs 在有机磷类杀虫药剂的抗性中经常是一个主要因子[4]。桃蚜 *Myzus persicae*[10]、家蝇 *Musca domestica*[16,17]、棉蚜 *Aphis gossypii*[18]、棉粉虱 *Bemisia tabaci*[19] 以及一些蚊类[20]等的抗性均与该酶活性的提高有关，在我们的试验中，低剂量（LD_5）的诱导作用可以改变棉铃虫体内 CarEs 对底物的亲和力和活性，而且不同类型的药剂影响的质和量不同。试验的 3 种植物次生性物质对棉铃虫幼虫的 CarEs 均有明显的诱导作用。这些结果对于正确的选择药剂用于棉铃虫的防治具有重要的指导意义。

参 考 文 献

1　Dauterman W C. Insect metabolism: extramicrosomal. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, Vol 12. New York: Pergamon Press, 1985, 713～730

2　Matsumura F. Metabolism of insecticides by animals and plants. In: Matsumura F 2th. Ed. Toxicology of Insecticides. New York: Plenum Press, 1985, 203～298

3　Soderlund D M, Bloomquist J R. Molecular Resistance in Arthropods. In: Roush R T, Tabashnik B E eds. Pesticide

Resistance in Arthropods. New York: Chapman & Hall Press, 1990, 58～96

4 Brattsten L B. Resistance mechanisms to carbamate and organophosphate insecticides. In: Green M B, Lebaron H M, Moberg W K eds. Managing Resistance to Agrochemicals. Washington, DC: American Chemical Society, 1990, 42～60

5 Read W, Paker C S. *Heliothis*: a global problem. In: Proceedings of the International Workshop on *Heliothis* Management (1981), ICRISAT, 1982, 9～14

6 高希武，梁同庭．阿特拉津和敌敌畏对棉铃虫和家蝇羧酸酯酶以及GSH-S-转移酶的诱导作用．昆虫学报，1993，36：166～177

7 高希武，郑炳宗，林 彬．棉铃虫抗药性的毒理学和生物化学．见：中国科协第二届青年学术年会执行委员会编．生命科学进展．北京：中国科学技术出版社，1995．365～372

8 Asperen van K. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol., 1962, 8: 401～416

9 张龙翔，张庭芳，李令媛主编．生化实验方法和技术．北京：高等教育出版社，1987

10 Devonshire A L, Moores G D. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). Pestic. Biochem. & Physiol., 1982, 18: 235～246

11 Doichuangam K. The role of non-specific esterase in insecticide resistance to malathion in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. Comparative Biochemistry and Physiology-C, Comparative Pharmacology and Toxicology. 1989, 93: 81～85

12 Hemingway J. Malathion carboxylesterase enzymes in *Anopheles arabiensis* from Sudan. Pestic. Biochem. & Physiol., 1985, 23: 309～313

13 唐振华，周成理．解毒酯酶在小菜蛾幼虫抗药性中的作用．昆虫学报，1993，36 (1)：3～13

14 Chang C K, Whalon M E. Substrate specificities and multiple forms of esterases in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). Pestic. Biochem. & Physiol., 1987, 27: 30～35

15 Gao X W, Zheng B Z, Zhang F *et al*. Substrate specificity and developmental changes of acetylcholinesterase (AchE) in cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner). Entomologia Sinica, 1995, 3: 80～89

16 Oppenoorth F J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: Kerkut G A, Gilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, Vol 12, New York: Pergamon Press, 1985, 731～773

17 Kao L R, Motoyama N, Dauterman W C. The purification and characterization of esterases from insecticide resistant and susceptible house flies. Pestic. Biochem. & Physiol., 1985, 23: 228～239

18 郑炳宗，高希武，王政国等．棉蚜对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂抗性机制研究．植物保护学报，1989，16：131～138

19 Byrne F, Devonshire A L. Insensitive acetylcholinesterase and esterase polymorphism in susceptible and resistant populations of the tobacco whitefly *Bemista tabaci* (Genn.). Pestic. Biochem. & Physiol., 1993, 45: 34～42

20 Vellani F, Hemingway J. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipens* from Italy. Pestic. Biochem. & Physiol., 1987, 27: 218～228

INDUCTION OF CARBOXYLESTERASE IN *HELICOVERPA ARMIGERA* BY INSECTICIDES AND PLANT ALLELOCHEMICALS

Gao Xiwu　Zhao Ying　Wang Xu　Dong Xiangli　Zheng Bingzong

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract　Induction of carboxylesterase (CarEs) by insecticides and plant allelochemicals and developmental changes of CarEs were investigated during 1992～1996 in cotton bollworms, *Helicoverpa armigera* (Hübner). The specific activities of midgut CarEs increased slowly before 5th day and then rose rapidly in larvae. The specific activity started to reduce from 8th day larvae to prepupae and then rose again. E2, E4, E5, E6, E7 and E9 activities in nine isoenzyme bands obtained by polyacrylamide gel electrophoresis were higher using β-naphthyl acetate than α-naphthyl acetate as substrate, whereas E1, E3 and E8 activities were reversed. Parathion, malathion, fenthion, SV1, methomyl and deltamethrin at sublethal dosage made the total activities of CarEs reduce, but malathion induced the activities of E4 and E5 in six isoenzyme bands at 48h after treatment by malathion and depressed the activities of E1, E2, E3 and E6. Plant allelochemicals, rutin, quercetin and 2-tridaconone, can significantly induced CarE activities of larvae.

Key words　*Helicoverpa armigera*, carboxylesterase, insecticide, plant allelochemical